

2/9/1 DIALOG(R)File 324:German Patents Fulltext (c) 2005 Univentio. All rts. reserv.

0002432737

Patent and Priority Information (Country, Number, Date):

Patent: DE 8607324 U1 19880630

Application: DE 8607324 19860317

Priority Application: DE 8607324 U 19860317 (DE 8607324)

Main International Patent Class: G01N-030/60

International Patent Class: G01N-030/48; G01N-035/00; G01N-033/53;  
G01N-033/563; C12Q-001/00

Main European Patent Class: G01N-030/60

European Patent Class: G01N-033/538

Publication Language: German

Fulltext Word Count (English): 4845

Fulltext Word Count (German) : 4183

Fulltext Word Count (Both) : 9028

Description (English machine translation)

The invention concerns a chromatographische column for immunological uentersuchungsverfahren.

With such a chromatographischen column Separations-1 are to be accomplished muddled for immunological regulations, in particular fluorescence -, enzyme or luminescence-immunological under = searches, with those the formed antigen anti-body complex from the free, not antigens bound at the anti-body with the help of the dry chromatographischen column are separated, which is given up the liquid reaction mixture of the immunological regulation and whereby the antigen anti-body complex solution is extinction-photometrically measured.

Since then 1960 S.A. Berson, R.S:

Yalam and R.

Bkins the the principle the of the Ligandenbindungsassays find have, have the the Radioimmunassay and its descendant as method the of the choice to the quantitative determination of small quantity in biological material, food etc. a a far spreading experience.

Disadvantages of this method are obviously handling with radioisotopes as well as of them limited durability, which impairs above all also its use in countries of the third world, in which the supply and disposal by commercial kit manufacturers not in industriellen countries are comparable.

As alternative methods enzyme Immunoassays, were developed fluorescence Immunoassays or luminescence Immunoassays whereby the regulation takes place extinction-photometrically.

The invention is the basis d?'e task to suggest a particularly inexpensive and chromatographische column for such investigation procedures, which can be handled simply those in particularly simple and reliable way reactions; Separation and measurement of the substances which can be examined make possible. With the well-known universally applicable separation techniques, like ueefn solvent phase system, so far bei Lumineszenzvr was rfahrendurch a Ansetzen of particles to take particularly with the Coated tube Aessay, a with difficulty eliminating Background in purchase because falsifying substances at the tube wall were absorbed and substantial Spuelr of procedures were necessary.

If it concerned so far radioirmunologische separate ion procedures, then remained the problem of the disposal of the radioactive liquid, which brought a Kontarainationsgefahr apart from the expenditure of time first of all with itself.

02/16/2005

as reaction container with perforatable cover. Second serves upper section as separation and measuring cup and contains ii closely fit in into a Kunststoffhülse the column-like filter paper, in the lower section takes place the extinction-photometric measurement. Instead of the use of 2 micro cuvettes also only one device is conceivable, whereby the described reaction part with perforatable soil and down separate above and measure-hurry are arranged. Frennteil consists of the filter paper column described above, above trichterförmig expand and in the force fit under the soil of the reaction part put. That measure-hurry is a Mikroküvette, which is pushed from down over the plastic case of the reaction part. With these Aeusführungsform is it possible, the reagents with exception of the substance which can be determined at low temperatures, in particular below -20 °C lyophilisieren. Finally is with employment of the measure after the invention in automats possible, all columns by only one admission procedure, manual or machine to train perforatable. The admission of the column takes place, as with all training further the invention, from above. A particularly appropriate important further training of the invention is to be seen in it, the kreppförmige Filtermaterial for the increase of its connection affinity with an organic acid, in particular ttelein or oxalic acid or if necessary a cousin to impregnate; and the impregnating agent again to wash, this lends to the again-dried paper by a certain swelling of the fibers an improved absorption capacity and differentiation of the absorption. I! II II III 1 1 1 II II III 1..

For example Aeusführungsformen are to be described now with reference to the enclosed designs more near, in those Fig. 1 a chromatographische column for the radio-immunological untersuchungsverfahren (radio Immuno Assay.RIA); Fig. 2 a chromatographische column e.g. for fluoreszenz or luminescence-immunological Untersuchungsmethoden; Fig. 3 an execution form with micro cuvette; Fig. 4/5 reaction container and Messgefäß for automats und Fig. 6 a further execution form shows.

Fig. 1 shows for radio-immunological regulations a Probenröhrchen 10, into which a standing chromatographische column is close 12 eingebracht, which have for instance in the center a soil 14. The putrid with exception of the filter paper and the Probenröhrchen consist of a transparent plastic, preferably of polyethylene. The soil 14 of the reaction container is firm and sealed concerning the Saugfuge attached. The soil 14 is with 16 conical or trichterförmig downward trained and had a thin perforatable basis 18.

From the taper of the funnel soil results an appropriate annular space 20, which is formed from the inner wall of the straight column pipe and the external wall of the funnel-like soil and approaches above pointedly. This simple construction is used, in order to make in way describing down a compression joint possible. Complementary to this funnel soil has filter and measure-hurry the separation container a case, which changes into a complementary trichterförmig expand part 22. The case can consist of metal, in addition, of plastic. Into the case close-Inge-presses a filter is 30 of prepared Krepp paper, which forms the actual column material. It has a casing 32 from an outside rigid plastic. The column material can exist made of cellulose, which was pre-treated with chemical impregnants e.g. with organic acids, preferably mark in or oxalic acid or if necessary with a

cousin. The reaction tube provided with case is put in such a way into the funnel beginning of the column that the filter 30 contacts the perforatable soil.

At the time of the execution according to invention of the sample regulation the reagents are pipetted into the reaction part of 13. After attitude of the reaction equilibrium to ade of the incubation period wirc with a pointed article the trichterfoermige soil of the reaction part from down or, preferentially from above, and zwcr a good piece perforates into the Kreppfilter inside. The liquid reaction mixture runs by the perforated soil into the saeulenfoermigen filter. The separation takes place in the form that the free phase, i.e. the free, not antigens in the upper column section, bound at anti-bodies, are absorbed, while the bound phase, i.e. the antigen/anti-body complex move into the lower column section. All radioactive liquid is up-sucked by the waterproof coated filter paper and can become thus without contamination danger easily entsorgt. During the test procedure naturally the tube with a cover 40 can be locked. By the close request of the filter material at the soil of the reaction container and continuous puncturing an excellent wetting of the entire column material 30 is ensured. Change possibilities of the senkrechten adjustment of ties filter paper with case within the entire column are naturally possible, like small ribs at a part, recesses at the other part, a ring bulge at the trichterfoermigen soil and an enular groove at the expand case the etc.. To enter afterwards is still that the upper column section, which is fit in reaction container 13, over an expand part 36 (passport collars) into the pipe 10, CH Mwam Mftuea ' \*.....

;; '..".i", Fig. a

AEUsfuehungsbeispiel shows 2/in particular for luminescence -, fluorescence and enzyme-immunological Untersuchungsverfahren, in a pipe 50 is pushed in a similar construction as full in Fig, 1 in form of a column 52 with saeulenkopf 54 fitting in against the pipe inside, acted it with the construction of the Fig. 1 in wesentliehshsi the ABBOTT Hulssnaufu bit UN dsss larmon FiH ore around Moiall in relatively short training of the on widening, then is regarded a short piece of filters 56, if necessary with plastic outer hull, as the luminescence procedure only in a for example long metallic case pipe 57. One for example from plastic existing expand seal 59 is in similar way as in Fig. 1 over the complementary funnel soil 58 of the column put. This time the expand case/screen goes containing 59 to completely above at the intermediate or annular space formed between the inside of the straight column pipe and the exterior of the trichterfoermigen soil 58 and is fullly in this with small pressure. Also the if necessary metallic and case pipe 57 for the adjustment of the filter, consisting of galvanized copper, serves as screen. After the representation the column is down diagonally cut, in order to guarantee a dripping off only if necessary of the liquid existing in small quantities obligatorily. Execution forms without screen 59 are possible. The filter paper can be pressed also into the capillary covering the fluorescence-immunological investigation to become the reagents into the reaction part of 60 of the chromatographischen column including the marking substance pipetted. After attitude of the reaction equilibrium the trichterfoermige soil of the reaction part to to that is perforated closely under it lying filter paper and the liquid reaction mixture flows from above into the filter column. The components are separated, as the free phase in the upper column section is bound and the bound phase, i.e. the

antigen/anti-body/complex the rectifying column which can be measured goes through and on the soil of the sample tube down drips and here thus extinction-photometrically be measured can.

The screen 59 can be eingefärbt.

Fig. 3 shows a Ausführuungsform with a Messkammer 66, which is designed as Mikrokuvette and is usefully used within the lower range 68 constricted around also for very small quantities of abgefilterter liquid. It is interesting that the same column 70 with practically the same funnel-like soil 72, as concerning Fig. 1 and 2, passes into these Mikrokuvette and pushed in simply with their lower open end of 74 is described. In this case the filter material 76 pressed into a plastic covering 78, which fits closely to that perforatable soil 80 of the trichterförmigen reaction container, is. The reaction container can be final again by a cover 40. Similarly as in Fig. 1 the lower end of the pipe forms here the micro cuvette the measuring cup, the column 70 the reaction and separation container. The Antigen/Antikörper/Komplex can again photometrically gemessen to become. In this case no separate screen is intended, can be arranged however. It acts with the micro cuvette around a construction also out of instrumentation reasons particularly small soil 82.

Particularly for automats the micro cuvettes 86 and 88 of the figures 4 and 5 are suitable. The micro cuvette 86 forms the reaction container, the micro cuvette 88 the Fig. 5 the measuring cup.

The micro cuvettes can be arranged for example grouped in racks. During the measurement the reaction container is then always changed and measured only into the measuring cup. The two containers are final by closing covers plug-in 88. The micro cuvettes are down again constricted, in order to fit once well into the owner of the automat, on the other hand, in order to be able to measure also smallest defined volumes, how is to be seen with 90. During the sample investigation in immunological procedures, particularly with fluorescence-immunological regulations pipetting the reagents takes place into the micro cuvette 86 as reaction container at certain operational sequence. After 1 (' 1 1) ending the incubation period the reaction mixture will become aspiriert and separated in the absorption cell 88 on the filter given, if the liquid the säulenförmigen filter go through, the components as for Fig. 2 or 3 described. The liquid on the soil of the absorption cell contains the antigen/anti-body/complex and can photometrically be measured. The micro cuvette 88 knows the same form as the micro cuvette 86 the Fig. 4 have. With the filter it can act around uaeaeyleiuehe FilteiraeeEeifiael as suehori described and down more near described. The filter material is given here to the micro cuvette 88 full filling out for example case 94 consisting of Kuenststoff to the interior extent.

Via the measure after the invention the test task in the described chromatographischen column, in the center section is effected thus filtered above and measured separated, down.

With the column material it acts around a dry

Adsorptionsmittel out of nonpolar material in form of a homogeneous felted kreppförmigen and to a close column rolled filter paper with high degree of purity. The filter paper consists 3000 of pure Linters with a Polperisationsgrad of 2000-more of rain advice cellulose with a polymerizing degree of 800 -3000 and is free from soluble materials. The used filter paper possesses an even texture with pores in the order of magnitude of 1-14/um and exhibits

over the height of the column an even absorbency. In order to increase the connection affinity, the filter paper is with sour ones, preferably Maleinoder oxalic acid, if necessary also with Basen treated. The separation takes place fast and extremely precisely via cooperating the force of gravity and capillary forces. The Aeuftrennung takes place surprisingly in such a way that the low-molecular components (free antigens and anti-bodies) in the upper column section, i.e. after short running time are bound, while the high-molecular Antigen/Aentikoerper/Komplexe wanders through freely the column. In Fig. , the complexes remain to 1, with down final column in the lower column section. In Fig. the complex is contained 2 with down open column in of the Pluessigkeit dripping off downward. Probably Aedsorptionsmittel outweigh van the Waalsl and hydrophobe reciprocal effects with 'erwendeten commutating arene, which can explain the migration behavior.

!Bei all Aeusfuehrungsformen can all reagents with exception of the substance in the column, which can be determined, be lyophilisiert.

i l ffie Aeusfuehrungsforic after Fig. 1 for radio immunological regulations contains a metal screen in the upper filter section, so that only the radioactivity of the Antigen/Antikorper/Komplexes down present is measured. Similarly contain the execution forms for fluorescence or lumineszenzimmunologifische investigations (Fig. 2, 3, 5) a screen from plastic around the column-like filter paper for avoidance of each light reflection.

, "; , 'V ' "i..', I ' ' ' ' !:!

' t i,, \*.....; Schlie Slich is it, for example possible for i for automats, still to perforate about through simultaneous prints a whole J series from columns to. This can take place for example l by hand or over a plate. For this with l could provide the spielsweise cover with long pointed points/teeth | its. The perforation became with pressure on the cover

he | follow. Here it would be however necessary, the "column" | to train sufficiently rigidly. The trichterfoermige soil of the column is essentially before-weakened trained. l by the measure after rter invention becomes extremely a t inexpensive precise and pollution free equipment l'&.

for the usual immunological procedures for the order | placed. l H n n example (regulation of Cortisol by Chemilumineszenz Immunoassay) Zur determination of the Cortisols in the serum the following, all are used appropriately in a kit contained reagents.

1. Anti-serum. The highly specific Antisarum became by Immunisierung of rabbits with an albumin (BSAe)/Cortisol-3-(O-Carboxylmethyl)-oxim-Konjugat won. The cross reaction of the anti-serum lit change endogenous Corticosteroiden is insignificant. The Cortisol bound to the endogenous Transportprotein(CBG) is set free instead of by a Deblokiermittel Merthiolat and TO by use of 0,1 mol/l Phtalat buffer pH 4.0.

2. As tracer Cortisoe Carboxyraethyloxim (4-Aminobutyl-N-ethyl)-isoluminal (Cortisol ABEI) became synthesized and used in the Phthalat buffer in the Chemilumineszenz Immunoassay.

3. Coritsoljjtandards in Cortisolfreient Huianserum, calibrates Reference preparation RK Steroid hormone international with the WHO roofridge. A kit contains 6 standards with the following concentrations lug/dl): 0, 1, 5, 10, 20, 50.

4. Dry chromatographische rectifying columns, which

were treated and dried as column material a gekrepptes filter paper of high degree of purity contained and with organic acids like 0.1 N maleic acid, 5. As catalyst Mikroperoxidase/H.O was used. The Qxidationssystem Mikroperexidase/H.O. proved as suitably: Here a micro peroxidase concentration of 5,u mol/l supplies the best results to 1,5 N NaOH with einerfLCL concentration of approximately 0.1 l.

Test procedure for the determination of an unknown quantity of Cortiael become serum samples of 5-i00e/ul, preferably 10/u! / 0,1 ml Cortisol Antikoerper and 0.1 ml tracers (Cortisol ABEI 10e molecular! admitted. The reaction mixture is inkubiert 30 minutes with space temperature up to the attitude of the reaction equilibrium. Afterwards the separation of the bound phase, i.e. the antigen anti-body complex from the free phase takes place via the fact that the soil of the reaction container with a Perforationskami is perforated; afterwards the reaction mixture flows from above by the dry chromatographische column after under, in order to improve the separation, after the run still 0.5 ml water is admitted. It is shown that in the upper section of the chromatographischen column the free phase is bound, while the bound phase is in the liquid with measuring tubes.

Subsequently, 200, ul NaOH are pipetted 1.5 N as well as 100, ul micro peroxidase 5,u rwl/l into the measuring tube. The measuring tube is brought into the measuring chamber of the Luiuenometers and the light-witnessing reaction is intiitert by injection by UO.ul H.O, 0.2 l. The surface under the Lichtintensitaets eit curve is integrated over a preselected time. TestauswertungDie evaluation of the results of measurement takes place using a calibration curve from 5 standards. For the production of the standard calibration curve the measured integral was laid on against the appropriate standard concentration after the Spline approximation Standardkurve.

The average value for the determination of the Nachweieempfindlichkeit is with 0,2 mg/dl Cortisol, i.e. Cortisol concentrations under 0,1 mg/dl Cortisol can be likewise measured with good reproductibility. The determination of the Intercept values indicates whether the relationship of the individual test components (AG, Ak, marking ice antigen) and the discrimination ability of the test system lie in eienm ideal range. The found Cortisol values for the 901 and the 501-Interceptpunkt are appropriate with 0,2 to 1.3 mg/dl Cortisol and/or, for 10 ms 20 mg/dl Cortisol in the optimal range and run over the entire ME Sbereich approximately linear, relative regaining vary thereby between 96 to f i j, K TC II left i l l t I' IN ' \* the t l \* t t l l l l t l \* H M t t ' l ' / , ' t another possibility of accomplishing a procedure in accordance with the invention consist of it (Fig. 6), with a reaction container 100 from a material, like before mentioned, if necessary after essay a not represented cap too Mach of the reaction in the container 100 and after addition of the marking substances filter and separate-hurries 106 closely to the l neck 102 of the reaction container put. Seals 104 are | suggested for this. It can concern in addition, every

other positive well sealing connection. Into separate and measure-hurry 106 is closely pressed in a filter 110 of the before-described kind. Pressing can be increased over only suggested ribs 112, which can be planned above and down. Measuring and separate-hurry is here continuous, i.e. it is omitted the above-mentioned perforatable soil. After the plug-on the whole is turned around 180degrees (placed on the head). The

solution goes through by in way described above the vcrpraeparierte filter. The measurement takes place in before-described way. The separation from head and floor part can be naturally made in more vainly different place, for example near the lower part of the Reaktionsgefaesses 108 or in another appropriate place. The supply preferably takes place as kit, containing the chromatographische column as well as the usual well-known reagents for a certain test procedure, if necessary in measured unit quantities. The measuring instrument can here also like the micro cuvette of the Fig. 5 (without soil which can be perforated) formed and with the Reaktionsgefaess plug togetherable trained its. European patent Attorneys POB 2SM471 WAO Mictal K ' G of 86 07 324,9 German patent lawyers Dr. W, Mueller Bore f Dr. Paul DeufelDipl. chem. one, Dipl. Wrtscb. Ing. Dr. Alfred SchoenDipl. Chem. Werner HertelDipl. Phys. Dietrich LewaldDipl. Ing. Dr. Engineer Dieter OttoDipl. in. Brit. Ckrtered Paoent agent PeterB.TunnidiffeM.A. (Oxon) Chtm. G 3465 Lw/Ge Dipl. Chem. Dr.rer.nat. Armin Gilak 5309 Meckenheim Merl Chro:, atographische column for immunological Untersuchungsverfahren

#### Description (German)

Die Erfindung betrifft eine chromatographische Saule fur immunologische untersuchungsverfahren.

Mit einer solchen chromatographischen Saule sollen Separations-1 verfahren fur immunologische Bestimmungen, insbesondere fluoreszenz-, enzym- oder lumineszenzimmunologische Unter= suchungen durchgefuhrt werden, bei denen der gebildete Antigen-Antikorper-Komplex von den freien, nicht am Antikorper gebundenen Antigenen mit Hilfe der trockenen chromatographischen Saule getrennt wird, welcher das flussige Reaktionsgemisch der immunologischen Bestimmung aufgegeben wird und wobei die Antigen-Antikorper-Komplex-Losung extinktionphotometrisch gemessen wird.

Seitdem 1960 S.A. Berson, R.S: Yalam und R. Bkins das Prinzip des Ligandenbindungsassays gefunden haben, haben der Radioimmunassay und seine Abkommlinge als Methode der Wahl zur quantitativen Bestimmung kleinster Substanzmengen in biologischem Material, Lebensmitteln u. a. eine weite Verbreitung erfahren. Nachteile dieser Methode sind offensichtlich der Umgang mit Radioisotopen sowie deren begrenzte Haltbarkeit, die vor allem auch ihre Nutzung in Landern der Dritten Welt beeintrachtigt, in denen die Versorgung und Entsorgung durch kommerzielle Kit-Hersteller nicht der in industriellen Landern vergleichbar ist. Als alternative Methoden wurden Enzym-Immunoassays, Fluoreszenz-Immunoassays oder Lumineszenz-Immunoassays entwickelt, wobei die Bestimmung extinktionsphotometrisch erfolgt.

Der Erfindung liegt d?'.e Aufgabe zugrunde, eine besonders preiswerte und einfach zu handhabende chromatographische Saule fur solche Untersuchungsverfahren vorzuschlagen, die in besonders einfacher und zuverlassiger Weise Reaktionen; Trennung und Messung der zu untersuchenden Substanzen ermöglicht. Bei den bekannten universell anwendbaren Trenntechniken, wie uefn Solid-Phase-System, war bisher bei Lumineszenzvr rfahrendurch ein Ansetzen von Partikeln, besonders beim Coated-Tube-Assay, ein schwer zu eliminierender Background in Kauf zu nehmen, weil verfalschende Substanzen an der Rohrchenwand absorbiert wurden und erhebliche Spulr Vorgange notwendig waren.

Handelte es sich bisher um radioimmunologische Separationsverfahren, so blieb das Problem der Entsorgung der radioaktiven Flussigkeit, was neben dem Zeitaufwand vor allen Dingen eine Kontarainationsgefahr mit sich



brachte.

Demgegenüber wird erfindungsgemäss die oben genannte Aufgabe bei einer trockenen chromatographischen Saule zum Separieren der Antigen-Antikörper-Komplexe von den freien, nicht an Antikörper gebundenen Antigenen und/oder zur vollständigen Bindung aller markierten Substanzen bei der immunologischen Bestimmung von Antigenen bzw. Haptenen nach radio-, fluoreszenz-, lumineszenz- oder enzymimmunologischen Bestimmungsmethoden, bei der in einer wasserfesten und wasserdichten Umhüllung als unpolares Säulenmaterial ein kreppförmiges dichtgerolltes Filterpapier mit hohem Reinheitsgrad, insbesondere aus Regeneratzellulose eingepresst ist, dadurch erreicht, daß die chromatographische stehende Saule einen oberen Reaktionsteil und einen unteren Trenn- und Meßteil aufweist, die durch einen perforierbaren Boden voneinander getrennt sind.

Hierdurch wird erreicht, dass Reaktion einerseits, Trennung und Messung andererseits, in einer einzigen Saule und zwar gegebenenfalls ohne ausseren Kontakt durchgeführt werden können, das zu untersuchende Material, insbesondere das radioaktive Material, vollständig im Filter verbleibt und in einfachster Weise mittels eines Gamma-Counters bei radioimmunologischen Untersuchungen bzw. photometrisch bei lumineszenzimmunologischen Untersuchungen gemessen werden kann. Als ein wichtiger erwünschter Nebeneffekt bei den radioimmunologischen Bestimmungen mit der erfindungsgemässen Saule ist anzusehen, dass bei radioimmunologischen Bestimmungen das gesamte radioaktive Reaktionsgemisch in der Saule aufgesaugt verbleibt. Nach der Auszählung der Probe liegt somit die Radiokativität in einer bequemen handhabbaren Form vor; die Gefahr einer Kontamination mit Resten des flüssigen Reaktionsgemisches ist gegenüber den üblichen Verfahren stark gesenkt. Auch wenn der Antikörper stationär an eine Träger-Substanz innerhalb des Proberöhrchens gebunden ist, wird die gesamte flüssige Radioaktivität in der Saule absorbiert; dabei werden gleichzeitig die freien Antigene im oberen Säulenabschnitt gebunden. Vorzugsweise wird die Filterpapiersaule von unten dicht an den perforierbaren Boden des oben aufschlagbaren Reaktionsteils herangesteckt. Hierdurch wird beim Perforieren bis in die

Tiefe des Filterpapiers ein besonders wirksames Eindringen und ein ebensolches Adsorbieren erreicht. Zweckmässig kann die Filterpapiersaule oben eine trichterartige Aufweitung haben, mit der sie in Klemmsitz unter den formähnlichen Boden der Saule gesteckt ist. Das Filterpapier kann in eine Kunststoffhülse eingepresst sein, die gegebenenfalls von einer metallischen Hülse, insbesondere aus verzinktem Kupfer umgeben ist. Diese eignet sich als Abschirmmaterial bei extinktionsphotometrischen bzw. radioimmunologischen Messungen. Die Perforierung kann von aussen genommen werden. Es ist aber auch möglich/ mit dem Boden in Berührung stehende feile mit Zacken Spitzen oder dergleichen auszustatten, die/ etwa bei Druck auf die beiden Enden der Saule dann den Boden perforieren (geschlossenes System). Eine besondere Anwendung

von Saule und Filter auf Autowaten ist erfindungsgemäss

II II II IUF tlll II l II l II ( ' l l II III l l l l II l l l l l l l l l l II l l l l l l \* \* l \* M H ! l .l II" ebenfalls in Betracht gezogen.

Hierbei werden zwei unten geschlossene röhrenartige Mikroküvetten nebeneinander angeordnet, wobei die erste als Reaktionsgefäss mit perforierbarem Deckel dient. Die zweite dient als Trenn- und Messgefäss und enthält im oberen Abschnitt dicht eingepasst in eine Kunststoffhülse das säulenartige Filterpapier, im unteren Abschnitt erfolgt die extinktionsphotometrische Messung. Statt der Verwendung von 2 Mikroküvetten ist auch eine einzige Vorrichtung denkbar, wobei oben der

beschriebene Reaktionsteil mit perforierbarem Boden und unten der Trenn- und Messteil angeordnet sind. Der Trennteil besteht aus der oben beschriebenen Filterpapiersaule, oben trichterförmig aufgeweitet und im Klemmsitz unter den Boden des Reaktionsteils gesteckt. Der Messteil ist eine Mikrokuvette, die von unten über die Kunststoffhülse des Reaktionsteils geschoben ist.

Bei dieser Ausführungsform ist es möglich, die Reagenzien mit Ausnahme der zu bestimmenden Substanz bei tiefen Temperaturen, insbesondere unterhalb -20 °C, zu lyophilisieren.

Schliesslich ist bei Einsatz der Massnahme nach der Erfindung in Automaten möglich, alle Säulen durch einen einzigen Beaufschlagungsvorgang, manuell oder apparativ, perforierbar auszubilden. Die Beaufschlagung der Säule erfolgt, wie bei allen Weiterbildungen der Erfindung, von oben.

Eine besonders zweckmässige wichtige Weiterbildung der Erfindung ist darin zu sehen, das kreppförmige Filtermaterial zur Erhöhung seiner Bindungsaffinität mit einer organischen Säure, insbesondere Malein- oder Oxalsäure oder gegebenenfalls einer Base, zu imprägnieren; und das Imprägniermittel wieder auszuwaschen. Dies verleiht dem wiedergetrockneten Papier durch eine gewisse Quellung der Fasern eine verbesserte Absorptionsfähigkeit und Differenzierung der Absorption.

1! II II III 1 1 1 II II III 1..

Beispielsweise Ausführungsformen sollen nun mit Bezug auf die beiliegenden Zeichnungen näher erläutert werden, in denen Fig. 1 eine chromatographische Säule für das radioimmunologische Untersuchungsverfahren (Radio-Immuno-Assay.RIA); Fig. 2 eine chromatographische Säule z.B. für Fluoreszenz- oder Lumineszenzimmunologische Untersuchungsmethoden; Fig. 3 eine Ausführungsform mit Mikrokuvette; Fig. 4 / 5 Reaktionsgefäss und Messgefäss für Automaten und Fig. 6 eine weitere Ausführungsform zeigt. Fig. 1 zeigt für radioimmunologische Bestimmungen ein Probenröhrchen 10, in das eine stehende chromatographische Säule 12 dicht eingebracht ist, die etwa in der Mitte über einen Boden 14 verfugt. Die Säule mit Ausnahme des Filterpapiers und das Probenröhrchen bestehen aus einem durchsichtigen Kunststoff, vorzugsweise aus Polyäthylen. Der Boden 14 des Reaktionsgefässes ist fest und abgedichtet bezüglich der Säule angebracht. Der Boden 14 ist bei 16 konisch oder trichterförmig nach unten ausgebildet und verfugt über eine dünne perforierbare Basis 18. Durch die Konizität des Trichterbodens entsteht ein entsprechender Ringraum 20, der aus der Innenwand des geraden Säulenröhrchens und der Aussenwand des trichterartigen Bodens gebildet ist und oben spitz zuläuft. Diese einfache Konstruktion wird ausgenutzt, um in unten zu beschreibender Weise eine Klemmverbindung zu ermöglichen.

Komplementär zu diesem Trichterboden verfugt der Filter- und Messteil des Trenngefässes über eine Hülse, die in einen komplementär trichterförmig aufgeweiteten Teil 22 übergeht. Die Hülse kann aus Metall, aber auch aus Kunststoff bestehen. In die Hülse ist dichteingepresst ein Filter 30 aus präpariertem Krepp-Papier, welches das eigentliche Säulenmaterial bildet. Es verfugt über eine Umhüllung 32 aus einem äusseren steifen Kunststoff. Das Säulenmaterial kann aus Zellulose bestehen, die mit chemischen Imprägnierungsmitteln z.B. mit organischen Säuren, vorzugsweise Malein- oder Oxalsäure oder ggf. mit einer Base, vorbehandelt wurde. Das mit Hülse versehene Reaktionsröhrchen wird in den Trichteransatz der Säule so eingesteckt, dass das Filter 30 den perforierbaren Boden kontaktiert. Bei der erfindungsgemässen Durchführung der Probenbestimmung werden die Reagenzien in den Reaktionsteil 13 pipettiert. Nach Einstellung des Reaktionsgleichgewichtes am Ende der Inkubationszeit wird mit einem spitzen Gegenstand der trichterförmige Boden des Reaktionsteils von unten oder, bevorzugt von oben, perforiert und zwar ein gutes Stück in das

Kreppfilter hinein. Das flussige Reaktionsgemisch läuft durch den perforierten Boden in den saulenförmigen Filter. Dabei erfolgt die Trennung in der Form, dass die ungebundene Phase, d.h. die freien, nicht an Antikörper gebundenen Antigene im oberen Säulenabschnitt absorbiert werden, während die gebundene Phase, d.h. der Antigen/Antikörper-Komplex in den unteren Säulenabschnitt wandert. Samtliche radioaktive Flüssigkeit wird von dem wasserdicht umhüllten Filterpapier aufgesogen und kann somit ohne Kontaminationsgefahr leicht entsorgt werden. Bei der Testdurchführung kann selbstverständlich das Röhrchen mit einem Deckel 40 verschlossen werden. Durch das enge Anliegen des Filtermaterials am Boden des Reaktionsgefäßes und das durchgehende Durchstechen ist eine ausgezeichnete Benetzung des gesamten Säulenmaterials 30 gewährleistet. Andere Möglichkeiten der senkrechten Fixierung des Filterpapiers mit Hülse innerhalb der gesamten Säule sind selbstverständlich möglich, wie kleine Rippen an dem einen Teil, Ausnehmungen am anderen Teil, ein Ringwulst am trichterförmigen Boden und eine Ringnut an der aufgeweiteten Hülse etc.. Nachzutragen ist noch, dass der obere Säulenabschnitt, das Reaktionsgefäß 13, über einen aufgeweiteten Teil 36 (Passkragen) in das Hüllrohr 10 eingepasst ist, -Ch Mwam Mftua' \*.....

; ; ',...".i", Fig. 2 zeigt ein Ausführungsbeispiel/ insbesondere für Lumineszenz-, fluoreszenz- und enzymimmunologische Untersuchungsverfahren, In einem Hüllrohr 50 wird eine ähnliche Konstruktion wie in Fig. 1 in Form einer Säule 52 mit Satt gegen die Hüllrohrinnenseite einpassenden Säulenkopf 54 eingeschoben, Handelte es sich bei der Konstruktion der Fig. 1 im wesentlichen um ein ABT Hüllrohr auf Bitumendichtungslinien um Moiall in relativ kurzer Ausbildung der Aufweitung, so ist für das Lumineszenzverfahren nur ein kurzes Stück Filter 56, gegebenenfalls mit Kunststoffaußenhülle, in einem beispielsweise langen metallischen Hülse Rohr 57 gehalten. Eine beispielsweise aus Kunststoff bestehende aufgeweitete Manschette 59 ist in ähnlicher Weise wie in Fig. 1 über den komplementären Trichterboden 58 der Säule gesteckt. Diesmal geht die aufgeweitete Hülse/Abschirmung 59 bis ganz oben an den zwischen der Innenseite des geraden Säulenrohrs und der Aussenseite des trichterförmigen Bodens 58 gebildeten Zwischen- oder Ringraum und ist satt in diesem bei geringem Andruck enthalten. Auch das gegebenenfalls metallische und aus verzinktem Kupfer bestehende Hülse Rohr 57 für die Fixierung des Filters dient als Abschirmung. Nach der Darstellung ist die Säule unten schräg zugeschnitten, um ein Abtropfen der nur in geringen Mengen gegebenenfalls vorhandenen Flüssigkeit zwangsweise sicherzustellen. Ausführungsformen ohne Abschirmung 59 sind möglich. Das Filterpapier kann auch in die Kapillarahülle eingepresst werden Zur fluoreszenzimmunologischen Untersuchung werden die Reagenzien in den Reaktionsteil 60 der chromatographischen Säule einschliesslich der markierenden Substanz pipettiert. Nach Einstellung des Reaktionsgleichgewichts wird der trichterförmige Boden des Reaktionsteils bis an das dicht darunter liegende Filterpapier perforiert und das flussige Reaktionsgemisch fließt von oben in die Filtersäule. Dabei werden die Komponenten getrennt, indem die freie Phase im oberen Säulenabschnitt gebunden wird und die gebundene Phase, d.h. der zu messende Antigen/Antikörper/Komplex die Trennsäule durchläuft und auf den Boden des Probenröhrchens hinunter tropft und hier also extinktionsphotometrisch gemessen werden kann. Die Abschirmung 59 kann eingeführt sein.

Fig. 3 zeigt eine Ausführungsform mit einer Messkammer 66, die als Mikrokuvette ausgebildet ist und/ um auch für sehr kleine Mengen abgefilterter Flüssigkeit brauchbar zu sein/ im unteren Bereich 68 eingeschnürt ist. Es ist interessant, dass die gleiche Säule 70 mit praktisch dem gleichen trichterartigen Boden 72, wie bezüglich Fig. 1 und 2 beschrieben, in diese Messküvette passt und einfach mit ihrem unteren

offenen Ende 74 eingeschoben wird. In diesem Fall ist das Filtermaterial 76 eingepresst in einer Kunststoffhülle 78, die dicht dem perforierbarem Boden 80 des trichterförmigen Reaktionsgefäßes anliegt. Das Reaktionsgefäß kann wieder durch einen Deckel 40 abgeschlossen sein. Ähnlich wie in Fig. 1 das untere Ende des Hüllrohres bildet hier die Mikrokuvette das Messgefäß, die Saule 70 das Reaktions- und Trenngefäß. Der Antigen/Antikörper/Komplex kann wieder photometrisch gemessen werden. In diesem Fall ist keine gesonderte Abschirmung vorgesehen, kann aber angeordnet werden. Es handelt sich bei der Mikrokuvette um eine Konstruktion mit aus messtechnischen Gründen besonders kleinem Boden 82. Besonders für Automaten sind die Mikrokuvetten 86 und 88 der Figuren 4 und 5 geeignet. Die Mikrokuvette 86 bildet das Reaktionsgefäß, die Mikrokuvette 88 das Messgefäß.

Die Mikrokuvetten können beispielsweise gruppiert in Racks angeordnet werden. Bei der Messung wird das Reaktionsgefäß dann immer übergangen und nur im Messgefäß gemessen. Die beiden Gefäße sind durch dichtschiessende steckbare Deckel 88 abgeschlossen. Die Mikrokuvetten sind unten wieder eingeschnürt, um einmal gut in den Halter des Automaten zu passen, zum anderen, um auch kleinste definierte Volumina messen zu können, wie bei 90 zu sehen ist. Bei der Probenuntersuchung nach immunologischen Verfahren, besonders bei fluoreszenzimmunologischen Bestimmungen erfolgt nach bestimmtem Ablauf das Pipettieren der Reagenzien in die Mikrokuvette 86 als Reaktionsgefäß. Nach Beendigung der Inkubationszeit wird das Reaktionsgemisch aspiriert und in der Messkuvette 88 auf den Filter gegeben, Wenn die Flüssigkeit den saulenförmigen Filter durchläuft, werden die Komponenten getrennt wie für Fig. 2 oder 3 beschrieben. Die Flüssigkeit auf dem Boden der Messkuvette enthält den Antigen/Antikörper/Komplex und kann photometrisch gemessen werden. Die Mikrokuvette 88 kann die gleiche Form wie die Mikrokuvette 86 der Fig. 4 haben. Beim Filter kann es sich um eine beliebige Filterart handeln. Das Filtermaterial wird hier in einen Innenumfang der Mikrokuvette 88 vollständig ausfüllende beispielsweise aus Kunststoff bestehende Hülse 94 gegeben.

Durch die Massnahme nach der Erfindung erfolgt also die Reagenzienaufgabe oben in der beschriebenen chromatographischen Säule, im Mittelteil wird gefiltert und getrennt, unten wird gemessen.

Beim Säulenmaterial handelt es sich um ein trockenes Adsorptionsmittel aus unpolarem Material in Form eines homogenen verfilzten kreppförmigen und zu einer dichten Säule gerollten Filterpapiers mit hohem Reinheitsgrad. Das Filterpapier besteht aus reinem Linters mit einem Polymerisationsgrad von 2000 - 3000 oder aus Regeneratzellulose mit einem Polymerisationsgrad von 800 - 3000 und ist frei von löslichen Stoffen. Das verwendete Filterpapier besitzt eine gleichmassige Textur mit Poren in der Größenordnung von 1 - 14 µm und weist über der Höhe der Säule eine gleichmassige Saugfähigkeit auf. Um die Bindungsaffinität zu erhöhen, ist das Filterpapier mit Säuren, vorzugsweise Malein oder Oxalsäure, ggf. auch mit Basen behandelt. Die Trennung erfolgt schnell und äußerst präzise durch das Zusammenwirken von Schwerkraft und Kapillarkraften. Die Auftrennung erfolgt überraschenderweise so, dass die niedermolekularen Bestandteile (freie Antigene und Antikörper) im oberen Säulenabschnitt, d.h. nach kurzer Laufzeit, gebunden werden, während die hochmolekularen Antigen/Antikörper/Komplexe ungehindert die Säule durchwandern. In Fig. 1, bei unten abgeschlossener Säule, verbleiben die Komplexe im unteren Säulenabschnitt. In Fig. 2 mit unten offener Säule ist der Komplex in der nach unten abtropfenden Flüssigkeit enthalten. Vermutlich überwiegen bei dem verwendeten unpolaren Adsorptionsmittel van der Waals- und hydrophobe Wechselwirkungen, die das Wanderungsverhalten erklären können.

!Bei allen Ausführungsformen können sämtliche Reagenzien mit Ausnahme der zu bestimmenden Substanz in der Saule lyophilisiert werden.

Die Ausführungsform nach Fig. 1 für radioimmunologische Bestimmungen enthält eine Metallabschirmung im oberen Filterabschnitt, so dass nur die Radioaktivität des unten befindlichen Antigen/Antikörper/Komplexes gemessen wird. Ähnlich enthalten die Ausführungsformen für fluoreszenz- oder lumineszenzimmunologische Untersuchungen (Fig. 2, 3, 5) eine Abschirmung aus Kunststoff um das säulenartige Filterpapier zur Vermeidung jeder Lichtreflexion.

Die Ausführungsform nach Fig. 1 ist beispielsweise für Automaten, noch in möglich, etwa durch gleichzeitiges Aufdrucken einer ganzen Serie von Säulen zu perforieren. Dies kann beispielsweise von Hand oder über eine Platte geschehen. Hierzu konnte beispielsweise der Deckel mit langen spitzen Zacken versehen sein. Die Perforation wurde bei Druck auf den Deckel erfolgen. Hier wäre es allerdings notwendig, die "Säule" ausreichend steif auszubilden. Der trichterförmige Boden der Säule wird im wesentlichen vorgeschwächt ausgebildet. Durch die Massnahme nach der Erfindung wird ein äußerst preiswertes präzises und umweltfreundliches Gerät geliefert.

Für die üblichen immunologischen Verfahren zur Verfügung gestellt.

Ein Beispiel (Bestimmung von Cortisol durch Chemilumineszenz-Immunoassay) Zur Bestimmung des Cortisols im Serum werden die folgenden, alle zweckmässig in einem Kit enthaltenen Reagenzien verwendet.

1. Antiserum. Das hochspezifische Antiserum wurde durch Immunisierung von Kaninchen mit einem Albumin (BSA)/Cortisol-3-(O-Carboxymethyl)-oxim-Konjugat gewonnen. Die Kreuzreaktion des Antiserums mit anderen endogenen Corticosteroiden ist unbedeutend. Das an das endogene Transportprotein (CBG) gebundene Cortisol wird statt durch ein Deblockierungsmittel Merthiolat und ANS durch Verwendung von 0,1 mol/l Phthalat-Puffer pH 4,0 freigesetzt.
  2. Als Tracer wurde Cortisol-Carboxyethyl-oxim (4-Aminobutyl-N-ethyl)-isoluminal (Cortisol ABEI) synthetisiert und im Phthalat-Puffer im Chemilumineszenz-Immunoassay verwendet.
  3. Cortisolstandards in Cortisolfreiem Humanserum, kalibriert mit der WHO First International Reference Preparation at Steroid Hormon. Ein Kit enthält 6 Standards mit folgenden Konzentrationen (µg/dl): 0, 1, 5, 10, 20, 50.
  4. Trockene chromatographische Trennsäulen, die als Säulenmaterial ein gekrepptes Filterpapier von hohem Reinheitsgrad enthalten und mit organischen Säuren wie 0,1 N Maleinsäure behandelt und getrocknet wurden.
  5. Als Katalysator wurde Mikroperoxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verwendet. Das Oxidationssystem Mikroperoxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hat sich als geeignet erwiesen: Hierbei liefert eine Mikroperoxidase-Konzentration von 5,0 µmol/l in 1,5 N NaOH bei einer Phthalat-Konzentration von etwa 0,1 µmol/l die besten Ergebnisse.
- Testdurchführung Zur Bestimmung einer unbekannten Menge von Cortisol werden zu Serumproben von 5 - 100 µl, vorzugsweise 10 µl, 0,1 ml Cortisol-Antikörper und 0,1 ml Tracer (Cortisol ABEI 10 molar) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 30 Minuten bei Raumtemperatur bis zur Einstellung des Reaktionsgleichgewichts inkubiert. Danach erfolgt die Trennung der gebundenen Phase, d.h. des Antigen-Antikörper-Komplexes von der freien Phase dadurch, dass der Boden des Reaktionsgefäßes mit einem Perforationskamm perforiert wird; danach fließt das Reaktionsgemisch von oben durch die trockene chromatographische Säule nach unten, um die Trennung zu verbessern, werden nach dem Durchlauf noch 0,5 ml Wasser zugegeben. Es zeigt sich, dass im oberen Abschnitt der chromatographischen Säule die freie Phase gebunden ist, während sich die gebundene Phase in der Flüssigkeit mit Messrohrchen befindet.

Anschliessend werden 200,ul NaOH 1,5 N sowie 100,ul Mikroperoxidase 5 ,u rwl/l in das Messrohrchen pipettiert. Das Messrohrchen wird in die Messkammer des Luinometers gebracht und die lichterzeugende Reaktion wird durch Injektion von UO.ul H.O, 0,2 l intiiert. Die Fläche unter der Lichtintensitäts-Zeit-Kurve wird über eine vorgewählte Zeit integriert. TestauswertungDie Auswertung der Messergebnisse erfolgt unter Verwendung einer Eichkurve aus 5 Standards. Zur Erstellung der Standard-Eichkurve wurde das gemessene Integral gegen die entsprechende Standard-Konzentration nach der Spline-Approximation-Standardkurve aufgetragen.

Der Mittelwert zur Bestimmung der Nachweieempfindlichkeit liegt bei 0,2 mg/dl Cortisol, d.h. Cortisol-Konzentrationen unter 0,1 mg/dl Cortisol können ebenfalls mit guter Reproduzierbarkeit gemessen werden. Die Bestimmung der Intercept-Werte gibt an, ob das Verhältnis der einzelnen Testkomponenten (Ag, Ak, markierteis Antigen) und die Diskriminierungsfähigkeit des Testsystems in einem idealen Bereich liegen. Die gefundenen Cortisol-Werte für den 901- und den 501-Interceptpunkt liegen mit 0,2 bis 1,3 mg/dl Cortisol bzw. 10 Ms 20 mg/dl Cortisol im optimalen Bereich und verlaufen über den gesamten Me Sbereich annähernd linear, Die relative Wiederfindung schwankt dabei zwischen 96 bis f i j , K H M I I l i i l l t I' I M ' \* t l \* t t l l l l t l \* H M t t ' l ' /,' t Eine andere Möglichkeit, ein Verfahren gemäss der Erfindung durchzuführen, besteht darin (Fig. 6), mit einem Reaktionsgefäss 100 aus einem Material, wie vorher erwähnt, gegebenenfalls nach Aufsatz einer nicht dargestellten Kappe zu arbeiten. Mach der Reaktion im Gefäss 100 und nach Zugabe der markierenden Substanzen wird der Filter- und Trennteil 106 dicht an den 1 Hals 102 des Reaktionsgefässes gesteckt. Dichtungen 104 sind | hierzu angedeutet. Es kann sich aber auch um jede andere formschlussige gut abdichtende Verbindung handeln. In dem Trenn- und Messteil 106 ist ein Filter 110 der vorbeschriebenen Art dicht eingepresst. Die Pressung kann über nur angedeutete Rippen 112, die oben und unten vorgesehen sein können, vergrössert werden. Der Mess- und Trennteil ist hierbei durchgehend, d.h. es fällt der vorher erwähnte perforierbare Boden fort. Nach dem Aufstecken wird das Ganze um 180degrees gedreht (auf den Kopf gestellt). Die Lösung läuft durch das in oben beschriebener Weise vcrpraparierte Filter durch. Die Messung erfolgt in vorbeschriebener Weise. Das Trennen von Kopf- und Bodenteil kann natürlich an eitler anderen Stelle, beispielsweise nahe dem unteren Teil des Rektionsgefässes 108 oder an einer anderen zweckmassigen Stelle vorgenommen werden.

Die Bereitstellung erfolgt vorzugsweise als Kit, enthaltend die chromatographische Saule sowie die ublichen bekannten Reagentien für ein bestimmtes Testverfahren, gegebenenfalls in abgemessenen Einheitsmengen. Das Messgerät kann hierbei auch wie die Mikrokuvette der Fig. 5 (ohne zu perforierenden Boden) geformt and mit dem Reaktionsgefäss zusammensteckbar ausgebildet sein.

European Patent Attoraey's POB 2SM471 WAO Mlictal K ' G 86 07 324.9  
Deutsche Patentanwalte Dr. W. Muller-Bore f Dr. Paul DeufelDipL-Chem.,  
Dipl.-Wrtscb.-Ing.

Dr. Alfred SchonDipl.-Chem.

Werner HertelDipI.-Phys.

Dietrich LewaldDipl.-Ing.

Dr. Ing. Dieter OttoDipl.-Ins.

Brit. Ckrtered Paont Agent PeterB.TunnidiffeM.A. (Oxon) Chtm.

G 3465 Lw/Ge Dipl.-Chem. Dr.rer.nat. Armin Gilak 5309 Meckenheim-Merl

Chro:,atographische Saule für immunologische Untersuchungsverfahren

Claims (English machine translation)

1. Chromatographi sau]2 for separating the antigen

anti-body complexes from the free, not at anti-bodies bound antigens

and/or for the complete connection of all marked substances with the immunological regulation from antigens and/or Haptenen to radio lumineszensfluoreszenz or ensymimmunologischen regulation methods, with which in a water resistant and waterproof casing as nonpolar column material a kreppfermiges rolled filter paper with high degree of purity, in particular from rain advice cellulose, is pressed in, by it characterized, da(3 the Chromatographi standing column from filter paper one obero from above subjectable reaction part of (13) and a lower separate and measure-hurry (10; 32 and/or. 50; 56 and/or. 76; > in a perforatable i 1,111 the t 1 exhibit 781 < ". \*... \*.! t!' D<80U Munich 2 POB 26024? '..."iJaeliel! I ' ToeWonl Telecopler Intoleue 0400 B telex Isaftdtplaiz0 D'B000e Miindion26 Mllebopat 003/221403'? Cli + Ill (OM)229B43 5'24285

2. 1 t 1 t t \* M t 1 1 1 IN
3. t t 1 1 1 1 t 1 1\*1
4. I 1 1)1
5. |1 III M soil (16; 22 and/or. 58 and/or. 80) from each other separated are. 2. Chromatographi column according to requirement 1, by the fact characterized that the column is closely to the perforatable soil of the column near-put from down.
3. Chroiatographi column according to requirement 2, by it characterized that the column carries a funnel-like Aeufweitung (16;53;72) above and outside, with which it into force fit under the soil of the column similar in the form is put. 4. Chromatographi column after one of the preceding requirements, by the fact characterized that the column from filter material is pressed into a plastic case, which is surrounded by a metallic case, in particular from galvanized copper, if necessary. 5. Chromatographi column after one of the requirements 1 to 3, by the fact characterized that the Filtermaterii part the column of a material, in particular plastic, when mating part is coated to the column inner wall, with which it against the conical and/or trichterfoermigen soil of the column is wedged.
6. Chromatographi column after one of the preceding requirements, by the fact characterized that the column is closely put altogether by means of a passport collar (36) at their upper end into a Kunststoffreage.nzroehrchen.
7. Chromatographi column after one of the preceding requirements, by the fact characterized that the filter is shielded part rter column for photometric measurements, against it the soil of the reaction part in particular \*
8. Chromatograephi column according to requirement 7, by it characterized, dafl the funnel-like expand Abschifm of aes aremporforief cash, funnels \* well-behaved soil exists in particular downward.
9. Chromatograephi column after a deil of requirements 3 1 to 7, by it characterized, that the tfficiitef | well-behaved aufgeweitere screen at the stick onable J filter part with the soil j sharp projections/leads perforating from down above is trained. |
10. i 10. Chromatographi column after one the preceding 1 requirements, by the fact characterized that the column is lockable by a cover f
11. Chromatograephi column after one the preceding jj i of requirements, by the fact characterized that the filter jj raaterialteil the column for the increase of its connection affinity 1 by chemical impregnants like organic acids,: in particular maleic acid or oxalic acid or if necessary a cousin, are prepared.

12. Alteration of the chromatographischen column according to requirement 1, characterized by a lower reaktionsbehälter (100! with plug-on filter and measure-hurry!106), in which itself, closely pressed, a j the wall closely locking, if necessary Kreppfiltermaterial before-prepared sitting in a covering for the increase of its connection affinity (110) find, whereby the column for the separation and measuring procedure is around 180degrees (on the head) rotatable and/or placable.

13. Chromatographi column after one of the requirements 1 to 11, with filter/in automats, thereby characterized, daess two down closed roehreh aertige micro cuvettes next to each other it is arranged that as reaction container a Saeuleriaefsaetz is intended or the micro cuvette is designed with perforatable cover as reaction container and is intended on more aeer second micro cuvette a separation or a measuring column essay with column made of filter paper or is inserted into the second micro cuvette the filter alone.

14. Chromatographi column according to requirement 13, by the fact characterized that the reagents with exception of the substance which can be determined are lyophilisierbar trained at low temperature, in particular under -20degreesC.

15. Chromatographi column according to requirement 13 or 14, by the fact characterized that with group-moderate employment of the micro cuvettes in automats all columns are perforatable trained by only one admission procedure, in particular by the human hand or a plate. S'oy/V06 LZ ' 9ld Rft/= \* > A left E'Old 99-% ' o > S ' oz left acre u, IF VI 1 II 9'9ld f 1 I) 1 FF IN |\*

16. i 1 l f I 16. i e f M t t mm t \* \* \* \* \*

II M i M l l t t M f III IN \* the 1 II \* M M

Claims (German)

1. Chromatographische sau]2 zum Separieren der Antigen-Antikörper-Komplexe von den freien, nicht an Antikörper gebundenen Antigenen und/oder zur vollständigen Bindung aller markierten Substanzen bei der immunologischen Bestimmung von Antigenen bzw. Haptenen nach radio- lumineszenzfluoreszenz- oder ensymimmunologischen Bestimmungsmethoden, bei der in einer wasserfesten und wasserdichten Umhüllung als unpolares Säulenmaterial ein kreppförmiges dichtgerolltes Filterpapier mit hohem Reinheitsgrad, insbesondere aus Regeneratzellulose, eingepresst ist, dadurch gekennzeichnet ,da(3 die Chromatographische stehende Säule aus Filterpapier einen obere von oben beaufschlagbaren Reaktionsteil (13) und einen unteren Trenn- und Messteil (10; 32 bzw. 50; 56 bzw. 76; 781 aufweist> die durch einen perforierbaren i 1 lll t 1 < " .\*.\*. ! t !' D<80U München 2 POB 26024?

'.. "iJaliet! I ' ToWonl Telecopler Intoleu 0400 B Telex Isaftdtplaiz0 D'BOOO Miindion26 Mllebopat 003/221403'? Cli + Ill (OM)229B43 5'24285

2. 1 t 1 t t \* M t 1 l 1 IM

3. t t 1 l l 1 t 1 1\*1

4. I 1 1)1

5. |l III M Boden (16; 22 bzw. 58 bzw. 80) voneinander getrennt sind.

2. Chromatographische Säule nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Säule von unten dicht an den perforierbaren Boden der Säule herangesteckt ist. 3. Chromatographische Säule nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Säule oben und aussen eine trichterartige Aufweitung (16;53;72) trägt, mit der sie in Klemmsitz unter den in der Form ähnlichen Boden der Säule gesteckt ist. 4. Chromatographische Säule nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet , dass die Säule aus Filtermaterial in eine Kunststoffhülse eingepresst ist, die gegebenenfalls von einer metallischen Hülse, insbesondere aus verzinktem Kupfer, umgeben ist. 5. Chromatographische Säule nach einem der Ansprüche



- 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Filtermaterialteil der Säule von einem Material, insbesondere Kunststoff, als Passteil zur Säuleninnenwand umhüllt ist, mit dem sie gegen den konischen bzw. trichterförmigen Boden der Säule geklemmt ist.
6. Chromatographische Säule nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Säule insgesamt mittels eines Passkragens (36) an ihrem oberen Ende in ein Kunststoffreagenzröhrchen dicht gesteckt ist.
7. Chromatographische Säule nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Filterteil der Säule insbesondere für photometrische Messungen, dagegen den Boden des Reaktionsteils abgeschirmt ist.
8. Chromatographische Säule nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die trichterartig aufgeweitete Abschliffanordnung perforiert ist, insbesondere nach unten trichterartigen Boden besteht.
9. Chromatographische Säule nach einem der Ansprüche 3 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die trichterartig aufgeweitete Abschliffanordnung oben an den ansteckbaren Filterteil mit dem Boden von unten perforierenden scharfen Vorsprüngen ausgebildet ist.
10. Chromatographische Säule nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Säule durch einen Deckel verschliessbar ist.
11. Chromatographische Säule nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Filtermaterialteil der Säule zur Erhöhung seiner Bindungsaffinität durch chemische Imprägnierungsmittel wie organische Säuren, insbesondere Maleinsäure oder Oxalsäure oder ggf. einer Base, präpariert ist.
12. Abänderung der chromatographischen Säule nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch einen unteren Reaktionsbehälter (100) mit aufsteckbarem Filter- und Messteil (106), in welchem sich, dicht gepresst, ein die Wandung dicht abschliessendes, gegebenenfalls in einer Hülle sitzendes zur Erhöhung seiner Bindungsaffinität vorpräpariertes Kreppfiltermaterial (110) befindet, wobei die Säule für den Trenn- und Messvorgang um 180 Grad (auf den Kopf) verdrehbar bzw. stellbar ist.
13. Chromatographische Säule nach einem der Ansprüche 1 bis 11, mit Filter/ in Automaten, dadurch gekennzeichnet, dass zwei unten geschlossene röhrenartige Mikroküvetten nebeneinander angeordnet sind, dass als Reaktionsgefäß ein Säulenaufsatz vorgesehen ist oder die Mikroküvette selbst als Reaktionsgefäß bei perforierbarem Deckel ausgebildet ist und auf der zweiten Mikroküvette ein Trenn- oder Messsäulenaufsatz mit Säule aus Filterpapier vorgesehen ist oder das Filter allein in die zweite Mikroküvette eingesetzt ist.
14. Chromatographische Säule nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Reagenzien mit Ausnahme der zu bestimmenden Substanz bei tiefer Temperatur, insbesondere unter -20 Grad C, lyophilisierbar ausgebildet sind.
15. Chromatographische Säule nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass bei gruppenmassigem Einsatz der Mikroküvetten in Automaten alle Säulen durch einen einzigen Beaufschlagungsvorgang, insbesondere durch die menschliche Hand oder eine Platte, perforierbar ausgebildet sind.
16. i 1 l f I 16. i e f M t t M M t \* \* \* \* I I M i M l l t t M f I I I I M \* 1 I I \* M M



© 2005 Dialog, a Thomson business